

65

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Opposition to EP-B1 0 422 339

Amgen Boulder Inc.

Our Ref.: C 2266 EP/OPP

Bescheinigung

Die BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH in 6507 Ingelheim....
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"TNF-Rezeptor, TNF bindende Proteine und
dafür kodierende DNAs"

am 21. Juni 1989 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

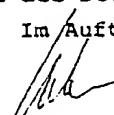
Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizu-
fügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit
dem am 21. Juni 1989 eingereichten Original überein.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die
Symbole C 12 N 5/00, C 12 N 1/20, C 12 N 1/14, C 12 P 21/00,
C 07 H 21/04, C 12 P 19/34, C 12 N 15/00 und A 61 K 37/02
der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 28. Mai 1990

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag


Keller

Kennzeichen: P 39 20 282.8

A 9151.1

12/099
DI Farn/St/Wa

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
6507 INGELHEIM AM RHEIN

TNF-Rezeptor, TNF bindende Proteine und dafür
kodierende DNAs

Die Erfindung bezieht sich auf einen TNF-Rezeptor sowie auf ein TNF bindendes Protein.

Tumornekrosefaktor (TNF- α) wurde erstmals im Serum von Mäusen und Kaninchen gefunden, die mit Bacillus Calmette-Guerin infiziert und denen Endotoxin injiziert worden war, und auf Grund seiner cytotoxischen und Antitumoreigenschaften erkannt (1). Er wird vor allem von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert. Zahlreiche Zelltypen, die Ziele für TNF sind, weisen Oberflächenrezeptoren mit hoher Affinität für dieses Polypeptid auf (2); es wurde angenommen, daß Lymphotoxin (TNF- β) an denselben Rezeptor bindet (3,4). TNF- α ist identisch mit einem als Cachectin bezeichneten Faktor (5), der die Lipoproteinlipase unterdrückt und bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen zur Hypertriglyceridämie führt (6,7). TNF- α dürfte an der Regulation des Wachstums sowie an der Differenzierung und Funktion von Zellen, die bei Entzündungen, Immunvorgängen und Hämatopoiese eine Rolle spielen, beteiligt sein.

TNF kann auf den Wirtsorganismus durch Stimulation von Neutrophilen (8,9) und Monocyten sowie durch Hemmung der Replikation von Viren (10,11) eine positive Wirkung ausüben. Darüberhinaus aktiviert TNF- α die Immunabwehr gegen Parasiten und wirkt direkt und/oder indirekt als Mediator bei Immunreaktionen, entzündlichen Prozessen und anderen Vorgängen im Organismus, wobei die Wirkmechanismen in vielen Fällen noch ungeklärt sind.

Die Verabreichung von TNF- α (12) kann jedoch auch von schädlichen Erscheinungen (13) wie Schock und Gewebeschädigungen begleitet sein, die durch Antikörper gegen TNF- α aufgehoben werden können (14). Eine Reihe

von Beobachtungen lässt auf eine Rolle von endogen freigesetztem TNF- α bei verschiedenen pathologischen Zuständen schließen. So scheint TNF- α ein Mediator der Kachexie zu sein, die bei chronisch-invasiven, z.B. parasitären Erkrankungen auftreten kann. TNF- α scheint auch eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des durch gram-negative Bakterien verursachten Schocks (Endotoxin-Schock) zu spielen; er dürfte an einigen, wenn nicht allen Wirkungen von Lipopolysacchariden beteiligt sein (18). Ebenso wurde eine Funktion von TNF bei den im Rahmen von entzündlichen Prozessen in Gelenken und anderen Geweben auftretenden Gewebeschädigungen sowie bei der Letalität und Morbidität der Graft-versus-host reaction (GVHR, Transplantat-Abstoßung (15) postuliert. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von TNF im Serum und dem tödlichen Ausgang von Meningokokkenerkrankungen berichtet (16).

Weiters wurde beobachtet, daß die Verabreichung von TNF- α über einen längeren Zeitraum einen Zustand von Anorexie und Auszehrung verursacht, die eine ähnliche Symptomatik aufweist wie die Kachexie, die mit neoplastischen und chronischen infektiösen Erkrankungen einhergeht (19).

Es wurde über eine TNF inhibierende Aktivität eines Proteins aus dem Harn von Fieberpatienten berichtet, von dessen Wirkung vermutet wird, daß sie auf einen kompetitiven Mechanismus auf Rezeptorebene selbst (ähnlich der Wirkung des Interleukin-1 Inhibitors (17)) zurückzuführen ist (20).

In der EP-A2 308 378 wird ein TNF inhibierendes Protein beschrieben, das aus menschlichem Harn gewonnen wurde. Seine Wirkung wurde im Harn gesunder und kranker

Personen nachgewiesen und aufgrund der Fähigkeit bestimmt, die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren auf humanen HeLa Zellen und FS 11 Fibroblasten sowie die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf murine A9 Zellen zu inhibieren. Das Protein wurde im wesentlichen zur Homogenität gereinigt und durch seinen N-Terminus charakterisiert. In dieser Patentveröffentlichung werden zwar grundsätzlich mögliche Wege dargelegt, zur für das Protein kodierenden DNA und zum rekombinanten Protein zu gelangen; es werden jedoch keine konkreten Angaben gemacht, welcher der theoretisch möglichen Lösungswege zum Ziel führt.

In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung konnte aus Dialyseharn von Urämiepatienten ebenfalls ein Protein identifiziert werden, das die biologischen Wirkungen von TNF- α hemmt, indem es durch Wechselwirkung mit TNF- α dessen Bindung an seinen Zelloberflächenrezeptor verhindert (21). Von diesem Protein wurde auch eine Affinität zu TNF- β festgestellt.

Die Anwesenheit dieses Proteins (im folgenden TNF-BP genannt) im konzentrierten Dialyseharn wurde durch Kompetition mit der Bindung von radioaktiv markiertem rekombinantem TNF- α an einen Subklon von HL-60 Zellen nachgewiesen, wobei der Einfluß von dialysiertem Harn auf die Bindung von 125 I-TNF- α an die Zellen gemessen wurde. Die durchgeführten Bindungsversuche zeigten eine dosisabhängige Hemmung der TNF- α -Bindung an die Zelle durch konzentrierten Dialyseharn (die Möglichkeit der Interpretation, daß die beobachtete Verringerung der Bindung durch gegebenenfalls im Harn vorhandenen TNF- α selbst oder TNF- β , der um die Bindung konkurriert, verursacht werden könnte, wurden durch den Befund, daß die Verringerung der Bindung durch

Anwendung von TNF- α - und TNF- β -Antikörpern nicht aufgehoben werden konnte, ausgeschlossen).

In analoger Weise wurde in Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung nachgewiesen, daß TNF-BP auch Affinität zu TNF- β aufweist, sie beträgt ca. 1/50 seiner Affinität zu TNF- α .

Mittels Gelchromatographie auf Sephadryl 200 wurde festgestellt, daß eine Substanz im Harn und Serum von Dialysepatienten sowie im Serum von gesunden Personen mit rekombinantem TNF- α einen Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 75 000 bildet.

TNF-BP wurde aus mehreren Proben Dialyseharn von Urämiepatienten durch partielle Reinigung mittels Druckultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie 62fach angereichert.

Die erhaltenen Präparationen wurden zum Nachweis der biologischen Aktivität von TNF-BP durch Hemmung der wachstumshemmenden Wirkung von TNF- α auf HL-60-10 Zellen verwendet. Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von TNF-BP auf die biologische Wirkung von TNF- α . Es wurde weiters das Bindungsverhalten von Zellen durch Vorbehandlung mit TNF-BP und ausschließendem Kompetitionsbindungs- test untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, daß Vorbehandlung der Zellen mit TNF-BP die Bindung von TNF- α an die Zelle nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, daß die Wirkung von TNF-BP nicht auf seiner etwaigen Bindung an die Zelle und Konkurrenzierung mit TNF- α um die Bindung an den Rezeptor beruht.

Das im wesentlichen homogene Protein wurde in hochgereinigter Form erhalten, indem Harn von

Dialysepatienten durch Ultrafiltration konzentriert,
 der konzentrierte Harn dialysiert und zunächst in
 einem ersten Reinigungsschritt mittels DEAE-Sephadex-
 Chromatographie auf das Vierfache angereichert wurde.
 Die weitere Anreicherung erfolgte mittels
 Affinitätschromatographie durch an Sepharose
 gebundenen TNF- α . Die Endreinigung wurde mittels
 Reverse Phase Chromatographie (FPLC) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß das im wesentlichen hochgereinigte Protein die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf WEHI 164 Klon 13 Zellen hemmt (22).

Vom im wesentlichen hochgereinigten Protein wurde die N-terminale Aminosäuresequenz aufgeklärt. Sie wurde mit Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln- (Hauptsequenz) bestimmt (daneben wurde in Spuren die folgende N-terminale Sequenz nachgewiesen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu- (Nebensequenz)). Der Vergleich der Hauptsequenz mit der N-terminalen Sequenz des in der EP-A2 308 378 geoffenbarten TNF inhibierenden Proteins zeigt die Identität der beiden Proteine.

Es wurde folgende Aminosäurezusammensetzung, angegeben in Mol-Aminosäure pro Mol Protein und in Mol % Aminosäure, bestimmt als Mittelwert einer 24 und 48 stündigen Hydrolyse, ermittelt:

Mol Aminosäure/	Mol %
Mol Protein	Aminosäure
<hr/>	
Asp + Asn	27,5
Thr	15,8
Ser	20,7
Glu + Gln	35,0
Pro	9,5
	10,9
	6,3
	8,2
	13,8
	3,8

Gly	16,0	6,3
Ala	4,2	1,7
Cys	32,3	12,8
Val	10,8	4,3
Met	1,1	0,4
Ile	7,0	2,8
Leu	20,2	8,0
Tyr	6,1	2,4
Phe	8,1	3,2
His	11,1	4,4
Lys	15,7	6,2
Arg	11,8	4,7
<hr/>		
Total	252,9	100
<hr/>		

Ein Gehalt an Glukosamin wurde mittels Aminosäureanalyse nachgewiesen. Die Ergebnisse eines mit Concanavalin A und Weizenkeimlektin durchgeföhrten Affinoblots zeigten ebenfalls, daß es sich bei TNF-BP um ein Glykoprotein handelt.

Das im wesentlichen homogene Protein wurde tryptisch verdaut und von 17 der erhaltenen Spaltpeptide die Aminosäuresequenzen bestimmt. Weiters wurde der C-Terminus analysiert.

TNF-BP kommt offensichtlich die Funktion eines Regulators der TNF-Aktivität mit der Fähigkeit zu, die Konzentrationsänderungen von freiem, biologisch aktivem TNF- α abzupuffern. TNF-BP dürfte auch die Ausscheidung von TNF durch die Niere beeinflussen, weil der mit TNF gebildete Komplex, dessen Molekulargewicht mittels Gelpermeationschromatographie auf Sephadex G 75 mit ca. 75000, bestimmt wurde, im

Gegensatz zu TNF offensichtlich nicht durch den Glomerulus zurückgehalten wird.

Das TNF-BP wurde aus dem Harn von Dialysepatienten als eine von drei Hauptproteinkomponenten, die Affinität zu TNF aufweisen und die gemeinsam mit TNF-BP von der TNF-Affinitätschromatographiesäule eluieren, nachgewiesen. Die beiden anderen Proteine binden jedoch offensichtlich in einer Weise, die die Bindung von TNF- α an seinen Zelloberflächenrezeptor nicht beeinträchtigt.

Die zur biologischen Wirkung des TNF-BP erhaltenen Ergebnisse, insbesondere der Vergleich der Bindungskonstante mit der für den TNF-Rezeptor beschriebenen Bindungskonstante (23) lieferten einen ersten Hinweis dafür, daß es sich bei diesem Protein um den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors handeln könnte.

Auf Grund seiner Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF- α und TNF- β zu inhibieren, ist das TNF bindende Protein geeignet, bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine Herabsetzung der TNF-Aktivität im Organismus angezeigt ist. Geeignet zur Anwendung bei diesen Indikationen sind auch Derivate oder Fragmente des TNF bindenden Proteins mit der Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF zu inhibieren.

TNF-BP (bzw. seine funktionellen Derivate oder aktiven Fragmente) kann zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt, eingesetzt werden. Zu diesen Erkrankungen zählen insbesondere entzündliche sowie infektiöse und parasitäre

- oder Schockzustände bei denen endogenes TNF- α freigesetzt wird, weiters Kachexie, Gvnk und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, etc. Es sind darunter auch pathologische Zustände zu verstehen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α , besonders bei hoher Dosierung, auftreten können, z.B. schwere Hypotension oder Störungen des Zentralnervensystems.

Als Arzneimittel kommen insbesondere pharmazeutische Zubereitungen für die parenterale Anwendung in Betracht, z.B. in Form von Lyophilisaten oder Lösungen, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen, wie Stabilisatoren. Auf Grund seiner TNF bindenden Eigenschaften ist TNF- β auch als Diagnostikum für die Bestimmung von TNF- α und/oder TNF- β geeignet, z.B. als eine der Komponenten in Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays, gegebenenfalls zusammen mit Antikörpern gegen TNF.

Auf Grund seiner Eigenschaften ist dieses Protein ein pharmakologisch wertvoller Wirkstoff, der aus natürlichen Quellen nicht in ausreichender Menge mittels proteinchemischer Methoden darstellbar ist.

Es bestand daher das Bedürfnis, dieses Protein (bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF zu binden) auf rekombinantern Weg herzustellen, um es für die therapeutische Anwendung in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen.

Unter der "Fähigkeit, TNF zu binden" ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Eigenschaft eines Proteins zu verstehen, an TNF- α derart zu binden, daß die Bindung von TNF- α an den funktionellen Teil des Rezeptors verhindert und die Wirkung von TNF- α im menschlichen oder tierischen Organismus gehemmt oder

aufgehoben wird. Durch diese Definition ist die Fähigkeit eines Proteins, auch an andere Proteine, z.B. an TNF- β , binden und deren Wirkung inhibieren zu können, mit eingeschlossen.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die für TNF- β P kodierende DNA zur Verfügung zu stellen, um auf deren Basis die Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle zu ermöglichen, mit denen geeignete Wirtsorganismen transformiert werden können, um TNF- β P bzw. funktionelle Derivate und Fragmente davon zu produzieren.

Im Rahmen dieser Aufgabenstellung sollte auch festgestellt werden, ob es sich beim TNF- β P um den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors handelt, um ausgehend davon die Grundlage für die Aufklärung der Rezeptorsequenz zu schaffen und einen rekombinanten TNF-Rezeptor bereitzustellen.

Das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors mit hoher Affinität zu TNF- α auf verschiedenen Zelltypen wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. Kürzlich wurde erstmals von der Isolierung und vorläufigen Charakterisierung eines TNF- α Rezeptors berichtet (32). Da die Bindung von radioaktiv markiertem TNF- α durch einen Überschuß an TNF- β aufgehoben werden kann (33), wurde vorgeschlagen, daß TNF- α und TNF- β einen gemeinsamen Rezeptor teilen. Da jedoch andererseits gezeigt werden konnte, daß bestimmte Zelltypen, die auf TNF- α ansprechen, gegen TNF- β teilweise oder gänzlich unempfindlich sind (34), wurde die Existenz eines gemeinsamen Rezeptors wieder in Zweifel gezogen. Im Gegensatz dazu scheinen kürzlich erhaltene Ergebnisse zu den Bindungseigenschaften von TNF- β an Rezeptoren die Theorie eines gemeinsamen Rezeptors

wieder zu erhärten (35), wobei in dieser Arbeit vorgeschlagen wird, daß zwischen TNF- α und TNF- β Unterschiede hinsichtlich der Wechselwirkung mit dem Rezeptor bzw. zusätzlich hinsichtlich der in der Zelle nach der Ligand-Rezeptorwechselwirkung eintretenden Ereignisse bestehen.

Die Verfügbarkeit der für einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA stellt die Voraussetzung für die Herstellung von rekombinantem Rezeptor und damit u.a. eine wesentliche Erleichterung für die Durchführung vergleichender Untersuchungen verschiedener Zelltypen auf ihre(n) TNF- α - und/oder TNF- β - Rezeptor(en) bzw. auf die durch die Bindung von TNF an den Rezeptor in der Zelle ausgelösten Reaktionen dar. Dadurch wird weiters die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors ermöglicht und damit die Voraussetzung für ein rationales Design für die Entwicklung von Agonisten und Antagonisten der TNF-Wirkung geschaffen.

Das Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe von Hybridisierungssonden, die von Aminosäuresequenzen kurzer Peptide abgeleitet sind, stößt auf Grund der Degeneration des genetischen Codes mitunter auf größere Schwierigkeiten. Zusätzlich erschwert wird diese Vorgangsweise dann, wenn von einem Protein, wie z.B. dem TNF- β P, nicht bekannt ist, in welchen Geweben es synthetisiert wird. In diesem Fall kann bei einem Versagen dieser Methode unter Umständen nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden, ob es auf die Wahl einer ungeeigneten cDNA-Bibliothek oder auf die zu geringe Spezifität der Hybridisierungssonden zurückzuführen ist.

Zur Lösung der gestellten Aufgabe wurde daher erfindungsgemäß wie folgt vorgegangen: Als cDNA-

Bibliothek wurde eine Bibliothek der Fibrosarkomzelllinie HS913 T, die mit TNF α induziert worden war und in Lambda gt11 vorlag, eingesetzt. Um aus dieser Bibliothek Lambda DNA mit TNF-BP Sequenzen zu erhalten, wurde die große Empfindlichkeit der Polymerase Kettenreaktion (PCR, (26)) ausgenutzt. (Mit Hilfe dieser Methode kann aus einer gesamten cDNA-Bibliothek eine unbekannte DNA-Sequenz erhalten werden, die flankiert ist von Oligonukleotiden, die auf Basis bekannter Aminosäureteilesequenzen entworfen und als Primer eingesetzt wurden. Ein solches längeres DNA-Fragment kann nachfolgend als Hybridisierungssonde, z.B. zur Isolierung von cDNA-Klonen, insbesondere des ursprünglichen cDNA-Klons, eingesetzt werden).

Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß auf Basis der N-terminalen Aminosäuresequenz (Hauptsequenz) und Aminosäuresequenzen von tryptischen Peptiden, die vom hochgereinigten TNF-BP erhalten worden waren, Hybridisierungssonden hergestellt wurden und mit Hilfe dieser Sonden zunächst mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek HS913T eine cDNA, die einen Teil der für TNF-BP kodierenden cDNA darstellt, erhalten wurde. Diese cDNA weist die folgende Nukleotidsequenz auf:

CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC
TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC
TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT
GAG AGC GGC TCC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG .

Diese DNA stellt eine von möglichen Varianten dar, die geeignet sind, mit TNF-BP-DNAs bzw. TNF-BP-RNAs zu hybridisieren (solche Varianten umfassen z.B. diejenigen DNA-Moleküle, die durch PCR-Amplifikation mit Hilfe von Primern erhalten werden, deren

Nukleotidsequenz nicht exakt mit der gesuchten Sequenz übereinstimmt, etwa aufgrund von zu Klonierungszwecken vorgesehenen Restriktionsschnittstellen oder aufgrund von bei der Aminosäuresequenzanalyse etwa nicht eindeutig ermittelten Aminosäuren).

Unter "TNF-BP-DNAs" bzw. "TNF-BP-RNAs" sind Nukleinsäuren zu verstehen, die für TNF-BP bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF zu binden kodieren bzw. die für ein solches Protein kodierende Sequenz enthalten.

Unter TNF-BP-DNAs (bzw. TNF-BP-RNAs) sind auch cDNAs, abgeleitet von mRNAs, die durch alternatives Splicing entstanden sind (bzw. diese mRNAs selbst), mitumfaßt. Unter "alternativem Splicing" wird die Entfernung von Introns verstanden, bei der vom gleichen mRNA-Precursor verschiedene Spliceacceptor- und/oder Splicedonorstellen verwendet werden. Die dabei entstehenden mRNAs unterscheiden sich voneinander durch das gänzliche oder teilweise Vorhandensein oder Fehlen von bestimmten Exonsequenzen, wobei es gegebenenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters kommen kann.

Die zunächst erfindungsgemäß erhaltene, einen Teil der für TNF-BP kodierenden Sequenz enthaltende cDNA (bzw. Varianten davon) kann somit als Hybridisierungssonde verwendet werden, um aus cDNA-Bibliotheken cDNA-Klone, enthaltend TNF-BP-DNAs, zu erhalten. Weiters kann sie als Hybridisierungssonde für mRNA-Präparationen eingesetzt werden, um TNF-BP-RNAs zu isolieren und daraus z.B. angereicherte cDNA-Bibliotheken herzustellen, die ein wesentlich vereinfachtes und effizienteres Screening ermöglichen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Isolierung der gewünschten

in unsere Kopie auch nicht leserlich.

DNAs als Hybridisierungssonden.

Da die oben definierte DNA (bzw. ihre Varianten) in der Lage ist, mit DNAs (bzw. RNAs) zu hybridisieren, die für TNF-BP kodieren bzw. die für TNF-BP kodierende Sequenz enthalten, können mit Hilfe dieser DNA als Sonde auch cDNAs erhalten werden, die für Proteine kodieren, deren Prozessierung TNF-BP ergibt. Unter Prozessierung ist die in vivo Abspaltung von Teilsequenzen zu verstehen. Dabei kann es sich N-terminal um die Signalsequenz und/oder andere Sequenzen und gegebenenfalls zusätzlich (falls sich die Annahme bestätigt, daß TNF-BP den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors darstellt) C-terminal um die transmembrane und zytoplasmatische Region des Rezeptors handeln. Mit Hilfe dieser Hybridisierungssonde ist es daher möglich, geeignete cDNA-Bibliotheken auf das Vorhandensein von cDNA, die die vollständige für einen TNF-Rezeptor kodierende Sequenz enthält, zu durchsuchen (dieser Vorgang kann erforderlichenfalls in mehreren Schritten erfolgen).

Erfindungsgemäß wurde die cDNA der oben definierten Sequenz, die mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek der TNF- α induzierten Fibrosarkomzelllinie HS913 T (in Lambda gt11), erhalten worden war, zum nochmaligen Durchsuchen der cDNA-Bibliothek verwendet, von den hybridisierenden Klonen die Lamda-DNA präpariert, subkloniert und sequenziert. Es wurde ein 1334 Basen langes cDNA Insert erhalten, das die für TNF-BP kodierende DNA enthält.

Die Erfindung betrifft eine DNA, kodierend für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden, bzw. für

ein Polypeptid, von dem dieses TNF-β eindeutig Leucin...
eine Teilsequenz darstellt.

Darunter sind auch solche DNAs zu verstehen, die für Teile dieser Polypeptide kodieren.

Die vollständige Nukleotidsequenz des längsten erhaltenen cDNA-Inserts ist in Fig.1 abgebildet.

Diese Nukleotidsequenz weist einen durchgehenden offenen Leserahmen auf, beginnend mit Base 213, bis zum Ende des 1334 bp langen cDNA Inserts. Da sich in demselben Leserahmen 4 Codons vor dem potentiellen Translationsstartcodon ATG (213-215) ein Stopcodon (TAG) befindet, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem Startcodon tatsächlich um den *in vivo* verwendeten Translationsstart handelt.

Der Vergleich der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Aminosäuresequenzen, die vom aminoterminalen Ende von TNF-βP und von tryptischen Peptiden bestimmt worden waren, zeigt hohe Übereinstimmung. Daraus ergibt sich, daß die isolierte cDNA die für das authentische TNF-βP kodierende Sequenz enthält.

Vom N-Terminus ausgehend ist die erste Sequenz, die eine Übereinstimmung mit einer tryptischen Spaltpeptidsequenz zeigt, die Sequenz von Fraktion 12 (Leu-Val-Pro-...), die auch als Nebensequenz bei der Analyse des N-Terminus von TNF-βP erhalten worden war. Dieses N-terminale Leucin entspricht der 30. Aminosäure in der cDNA Sequenz. Da der vorangehende Abschnitt von 29 Aminosäuren einen stark hydrophoben Charakter aufweist und es sich bei TNF-βP um ein sekretiertes Protein handelt, kann gefolgert werden, daß diese 29 Aminosäuren das für den Sekretionsvorgang

benötigte Signalpeptid darstellen, das bei der Sekretion abgespalten wird (in Figur 1 mit S1-S29 bezeichnet).

Die als Hauptsequenz bei der N-terminalen Analyse von TNF-BP erhaltene Aminosäuresequenz entspricht den Aminosäuren beginnend mit Asp-12 in der cDNA Sequenz. Dieser Asparaginsäurerest folgt direkt dem basischen Dipeptid Lys-Arg. Da nach diesem Dipeptid *in vivo* sehr viele Proteine proteolytisch gespalten werden, ist anzunehmen, daß TNF-BP mit N-terminalem Asp nicht direkt durch Prozessierung eines Precursors beim Sekretionsvorgang entsteht, sondern daß vom prozessierten Protein die N-terminalen 11 Aminosäuren zu einem späteren Zeitpunkt durch extrazelluläre Proteasen abgespalten werden.

Das carboxy-terminale Ende von TNF-BP war mit Ile-Glu-Asn bestimmt worden (C-terminale Analyse; tryptisches Peptid Fraktion 27: Aminosäuren 159-172, tryptisches Peptid Fraktion 21: Aminosäuren 165-172), wobei Asn der Position 172 in der cDNA Sequenz entspricht.

Potentielle N-Glykosylierungsstellen der allgemeinen Formel Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann, befinden sich an den Positionen 25-27 (Asn-Asn-Ser), 116-118 (Asn-Cys-Ser) und 122-124 (Asn-Gly-Thr) der TNF-BP cDNA Sequenz. (Däß Asn-25 glykosyliert ist, ergibt sich daraus, daß bei der Sequenzierung des entsprechenden tryptischen Spaltpeptids an dieser Stelle Asn nicht identifiziert werden konnte.)

Die Analyse der Nukleotid - bzw. der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz im Zusammenhang mit den durchgeföhrten proteinchemischen Untersuchungen zeigt, daß es sich bei TNF-BP um ein glykosyliertes Polypeptid mit 172 Aminosäuren, das durch

... artische Spaltung nach der 11. Aminosäure zu ein Glycoprotein mit 161 Aminosäuren umgewandelt wird, handelt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die sequenzierten tryptischen Peptide und die aus der cDNA Sequenz abgeleiteten korrespondierenden Aminosäuresequenzen:

Fraktion	Aminosäuren
12	1- 8
1	12- 19
8	20- 32
14/I	36- 48
20	36- 53
11	54- 67 (Aminosäuren 66-67 waren am Peptid nicht korrekt bestimmt worden)
14/II	79- 91
26	133-146
5	147-158
27	159-172

Die erhaltene cDNA stellt die Voraussetzung für die Herstellung von rekombinantem TNF-BP dar.

Gegenstand der Erfahrung ist somit weiters die für, vorzugsweise sekretierbares, TNF-BP kodierende DNA.

Durch Einbringen eines DNA-Konstruktes enthaltend die für TNF-BP kodierende Sequenz mit einer für ein Signalpeptid kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines geeigneten Promoters in geeignete Wirtsorganismen, zweckmäßigerweise in eukaryotische, bevorzugt höhere eukaryotische Zellen, kann TNF-BP produziert werden, das in den Zellüberstand sekretiert wird.

Im Falle der Verwendung eines Signalpeptids im Hinblick auf die Sekretion des Proteins wird zweckmässigerweise die für das Signalpeptid kodierende DNA vor das Codon für Asp-12 gefügt, um ein einheitliches Produkt zu erhalten. Grundsätzlich ist jedes Signalpeptid geeignet, das im entsprechenden Wirtsorganismus die Sekretion des reifen Proteins gewährleistet. Gegebenenfalls kann die Signalsequenz auch vor das für Leu-1 kodierende Triplet gesetzt werden, wobei in diesem Fall erforderlich sein kann, die durch Abspaltung des aus 11 Aminosäuren bestehenden Peptids am N-Terminus entstehende Form von TNF-BP vom nicht oder nicht vollständig prozessierten TNF-BP in einem zusätzlichen Reinigungsschritt zu trennen.

Da die cDNA nach dem Codon für Asn-172, das aufgrund der C-terminalen Analyse den C-Terminus darstellt, kein Stopcodon enthält, wird zweckmässigerweise im Hinblick auf die Expression von TNF-BP nach dem Codon für Asn 172 durch gerichtete Mutagenese ein Translationsstopcodon eingeführt.

Die für TNF-BP kodierende DNA kann durch Mutation, Transposition, Deletion, Addition oder Verkürzung modifiziert werden, sofern derartig modifizierte DNAs für (Poly)peptide mit der Fähigkeit, TNF zu binden, kodieren. Derartige Modifikationen können z.B. darin bestehen, eine oder mehrere der potentiellen, gegebenenfalls für die biologische Aktivität nicht erforderlichen, Glykosylierungsstellen zu verändern, indem z.B. das Asn-Codon durch ein für eine andere Aminosäure kodierendes Triplet ersetzt wird. Unter Berücksichtigung der Erhaltung der biologischen Aktivität können auch Modifikationen vorgenommen werden, die in einer Änderung der Disulfidbrücken (z.B. Verringerung deren Anzahl) resultieren.

Die eingeschlossene DNA-Möglichkeit zu einer Struktur für Voraussetzung für die Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle dar, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind. Mit solchen rekombinanten DNA-Molekülen in Form von Expressionsvektoren, enthaltend die für ein Protein mit TNF-BP Aktivität kodierende, gegebenenfalls in geeigneter Weise modifizierte DNA, vorzugsweise mit einer vorgeschalteten Signalsequenz, und die für die Expression des Proteins erforderlichen Kontrollsequenzen, können geeignete Wirtsorganismen transformiert, gezüchtet und das Protein gewonnen werden.

Ebenso wie etwaige Modifikationen der DNA-Sequenz erfolgt die Auswahl von für die Expression geeigneten Wirtsorganismen insbesondere im Hinblick auf die biologische Wirkung des Proteins, TNF zu binden. Darüberhinaus gehen die bei der Herstellung rekombinanter Proteine üblichen Kriterien wie Verträglichkeit mit dem gewählten Vektor, Prozessierungsfähigkeit, Isolierung des Proteins, Expressionscharakteristika, Sicherheits- und Kostenaspekte in die Entscheidung über den Wirtsorganismus ein. Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus dem für die Transformation vorgesehenen Wirt. Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, die die erfindungsgemäßen für TNF-BP kodierenden DNAs (bzw. Modifikationen davon) replizieren und exprimieren.

Im Hinblick auf die biologische Aktivität des Proteins ist bei der Expression der für TNF-BP kodierenden DNA vor allem der etwaigen Relevanz der beim natürlichen Protein festgestellten Kriterien Glykosylierung und hoher Anteil an Cysteinresten für die Eigenschaft, TNF zu binden, Rechnung zu tragen. Zweckmäßig werden daher

für die Expression Eukaryonten, insbesondere geeignet. Expressionssysteme höherer Eukaryonten, verwendet.

Auf Grund ihrer Fähigkeit, TNF zu binden, sind die erfindungsgemäßen rekombinanten Polypeptide geeignet, bei der prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt.

Da beim TNF-BP auch eine TNF- β inhibierende Wirkung nachgewiesen wurde, kann es (bzw. die verwandten bzw. modifizierten Polypeptide) in geeigneter Dosierung, gegebenenfalls in im Hinblick auf eine gesteigerte Affinität zu TNF- β modifizierter Form, auch für die Inhibierung der Wirkung von TNF- β im Organismus verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher weiters pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β wirksam hemmende Menge von TNF-BP bzw. einem verwandten Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden.

Die cDNA enthält, wie bereits erwähnt, nach dem Codon für Asn-172 nicht das Stopcodon, das aufgrund der Analyse des C-Terminus zu erwarten wäre, sondern der offene Leserahmen wird fortgesetzt. Die Region zwischen Val-183 und Met-204 hat einen stark hydrophoben Charakter. Dieser hydrophobe Bereich von 22 Aminosäuren, gefolgt von einem Abschnitt mit einem Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren (Arg-206, Arg-209) weist die typischen Merkmale einer Transmembrandomäne auf, die Proteine in der Zellmembran verankert. Der in Richtung C-Terminus

folgende Proteinanteil ist dagegen wieder stark hydrophil.

Das Hydrophobizitätsprofil ist in Fig.1 abgebildet (der Hydrophobizitätsplot wurde mit Hilfe des Mac Molly Programms (Fa. Soft Gene Berlin) erstellt; die Fensterweite für die Berechnung der Werte betrug 11 Aminosäuren. Hydrophobe Bereiche entsprechen positiven, hydrophile Bereiche negativen Werten auf der Ordinate. Auf der Abszisse ist die Zahl der Aminosäuren, beginnend mit dem Startmethionin S1, dargestellt).

Aus der Proteinstruktur ergibt sich, daß die für das lösliche, sekretierte TNF-BP kodierende DNA Teil einer für ein größeres Protein kodierenden DNA ist: Dieses Protein weist die Merkmale eines in der Zellmembran verankerten Proteins auf, enthält TNF-BP in für eine extrazelluläre Domäne typische Weise und weist einen beträchtlichen für zytoplasmatische Domänen typischen Abschnitt auf. Lösliches TNF-BP wird offensichtlich von dieser membrangebundenen Form durch proteolytische Spaltung knapp außerhalb der Transmembrandomäne erhalten.

Die Struktur des von der erhaltenen cDNA kodierten Proteins im Zusammenhang mit der Fähigkeit von TNF-BP, TNF zu binden, bestätigen die Annahme, daß es sich bei TNF-BP um einen Teil eines zellulären Oberflächenrezeptors für TNF handelt, dessen extrazelluläre, für die Bindung von TNF verantwortliche Domäne proteolytisch abgespalten werden kann und in Form des löslichen TNF-BP wiedergefunden wird. (Dabei soll nicht ausgeschlossen werden, daß im Hinblick auf die Funktionsfähigkeit des Rezeptors dieses Protein gegebenenfalls mit einem oder mehreren anderen Proteinen assoziiert ist.

(Für Zwecke der Produktion von TNF-BP in größerem Maßstab wird vorteilhafterweise nicht von der gesamten cDNA ausgegangen, weil das Erfordernis der Abspaltung von TNF-BP von dem Teil des Proteins, das den membrangebundenen Teil des TNF-Rezeptors darstellt, berücksichtigt werden müste. Es wird vielmehr, wie bereits angeführt, zweckmäßigerweise nach dem Codon für Asn-172 durch gerichtete Mutagenese ein Translationsstopcodon eingeführt, um eine über das C-terminale Ende von TNF-BP hinausgehende Proteinsynthese zu verhindern.)

Mit der erfindungsgemäß erhaltenen cDNA, die eine Teilsequenz der für einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA darstellt, gelangt man zur vollständigen Rezeptorsequenz, indem z.B. mittels modifizierter PCR (RACE = "rapid amplification of cDNA ends" (36)) das fehlende 3'-Ende mit Hilfe eines Primers, der aufgrund einer möglichst weit in Richtung 3'-Ende der vorhandenen cDNA gelegenen Sequenz konstruiert wurde, amplifiziert wird.
Eine alternative Methode besteht im konventionellen Screenen der cDNA-Bibliothek mit der verfügbaren cDNA bzw. Teilen davon als Sonde.

Gegenstand der Erfindung ist somit weiters die für einen TNF-Rezeptor kodierende DNA, die den in vivo translatierten Abschnitt der erfindungsgemäß erhaltenen cDNA bzw. degenerierte Varianten davon enthält. Damit sind auch DNAs mitumfaßt, die für C- und/oder N-terminal verkürzte, z.B. prozessierte, oder für modifizierte (z.B. durch Änderungen an proteolytischen Spaltstellen, Glykosylierungsstellen oder bestimmten Domänenbereichen) Formen bzw. für Fragmente, z.B. die verschiedenen Domänen, des TNF-Rezeptors kodieren.

Diese DNAs können in Verbindung mit den für die Expression erforderlichen Kontrollsequenzen als Bestandteil rekombinanter DNA-Moleküle zur Transformation von prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen verwendet werden. Dadurch wird einerseits die Voraussetzung geschaffen, den TNF-Rezeptor in größeren Mengen auf rekombinantem Weg herzustellen, um z.B. die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur zu ermöglichen. Andererseits können mit diesen DNAs höhere eukaryotische Zellen transformiert werden, um Studien über Mechanismen und Dynamik der TNF-Rezeptor-Wechselwirkung, der Signalübertragung bzw. über die diesbezügliche Relevanz der verschiedenen Rezeptordomänen bzw. Abschnitten davon zu erhalten. Der rekombinante TNF-Rezeptor (bzw. Fragmente oder Modifikationen davon) kann dazu verwendet werden, Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit TNF oder den TNF-Rezeptor bzw. auf ihren Einfluß auf die durch TNF induzierte Signalübertragung zu untersuchen. Derartige Screenings (unter Verwendung der Proteine/Fragmente bzw. von entsprechend transformierten höheren eukaryotischen Zellen) schaffen die Voraussetzung für die Identifizierung von Substanzen, die TNF substituieren, seine Bindung an den Rezeptor hemmen bzw. solche, die den Mechanismus der durch TNF ausgelösten Signalübertragung blockieren oder verstärken können.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung mitumfaßt sind auch Nukleinsäuren, die nicht für TNF-BP oder den Rezeptor kodieren, die jedoch unter Bedingungen niedriger Stringenz mit der erfindungsgemäß erhaltenen cDNA hybridisieren.

Im einzelnen wurde die gestellte Aufgabe wie folgt gelöst:

Vom hochgereinigten TNF-BP wurden die N-terminale Aminosäuresequenz sowie die Aminosäuresequenzen von durch tryptischen Verdau des Proteins erhaltenen Peptiden bestimmt.

Weiters wurde der C-Terminus durch Carboxypeptidase P Verdau, Derivatisierung der abgespaltenen Aminosäuren und chromatographische Auftrennung bestimmt.

Aus den durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptidsequenzen wurden im Hinblick auf ihren Einsatz in der PCR für die Herstellung von Oligonukleotiden Bereiche einerseits aus dem N-Terminus und andererseits aus einem tryptischen Peptid derart ausgewählt, daß die Komplexität von Mischoligonukleotiden für die Hybridisierung mit cDNA möglichst gering ist. Auf Basis dieser beiden Bereiche wurde je ein Satz Mischoligonukleotide hergestellt, wobei der vom N-terminal gelegenen Bereich abgeleitete entsprechend der mRNA und der vom tryptischen Peptid abgeleitete revers komplementär zur mRNA synthetisiert wurde. Um das nachfolgende Klonieren eines mit PCR amplifizierten Segments zu erleichtern, wurde der vom tryptischen Peptid abgeleitete Satz von Oligonukleotiden mit einer BamHI-Restriktionsstelle versehen. Darauf wurde Lambda-DNA aus der TNF- α induzierten Fibrosarkom cDNA-Bibliothek isoliert und daraus eine TNF-BP-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde kloniert und sequenziert; es weist 158 Nukleotide auf und enthält zwischen den beiden von den Primer Oligonukleotiden stammenden Sequenzabschnitten die für das tryptische Peptid 20 kodierende Sequenz.

Dieses DNA-Fragment wurde nachfolgend radioaktiv markiert und als Sonde zur Isolierung von cDNA-Klonen aus der Fibrosarkom-Bibliothek verwendet. Es wurde dazu so verfahren, daß zunächst Plaques mit der Sonde hybridisiert, Phagen von hybridisierenden Plaques vereinzelt und daraus Lambda DNA gewonnen wurden. Einzelne cDNA-Klone wurden subkloniert und sequenziert; zwei der charakterisierten Klone enthielten die für TNF-BP kodierende Sequenz.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Vorversuche und Beispiele näher erläutert:

Vorversuch 1

Herstellung von hochgereinigtem TNF-BP

a) Konzentration des Harns

200 l Dialyseharn von Urämiepatienten, aufbewahrt in Flaschen enthaltend EDTA (10 g/l), Tris (6 g/l), NaN_3 (1 g/l) und Benzamidinhydrochlorid (1 g/l) sowie kühl gelagert, wurden durch Ultrafiltration mittels einem hochdurchlässigen Hämokapillarfilter mit einer asymmetrischen Hohlfasermembran (FH 88H, Gambro) auf 4,2 l mit einem Proteingehalt von 567 g konzentriert. Der konzentrierte Harn wurde gegen 10mM/l Tris HCl, pH 8 dialysiert. Während dieses Vorgangs wurde, wie in den nachfolgenden Schritten (außer bei der Reverse Phase Chromatographie), 1mM/l Benzamidinhydrochlorid zugefügt, um proteolytischem Verdau entgegenzuwirken. Alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt.

b) Ionenaustauschchromatographie

Dieser Schritt wurde durchgeführt indem DEAE-Säulen (2,5 x 40 cm) mit Proben konzentrierter dialysierter Harns, enthaltend je ca. 75 g Proben, beschickt wurden. Eluiert wurde mit 800 ml einer 10mM Tris/HCl pH-8-Gradienten, wobei die NaCl Konzentration 0 bis 0,4 M betrug. Die das TNF-enthaltenden Fraktionen von sieben Säulen mit Gesamtproteingehalt von 114 g wurden bei -20°C gelagert.

c) Affinitätschromatographie

Zur Herstellung der TNF-Sepharosesäule wurde rTNF- α (1 mg) in 0,1 M NaHCO₃, 1 M NaCl, pH 9 (Kopplungspuffer) an 1,5 g cyanogenbromidaktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. Die Sepharose wurde in gequollen und mit Kopplungspuffer gewaschen. Nach Zusatz von rTNF- α wurde die Suspension 2 Stunden bei Raumtemperatur rotieren gelassen. Der Überfluss an CNBr-Gruppen wurde durch eineinhalbstündige Röhrchen mit 1M Ethanolamin, pH 8 blockiert. Die TNF-Sepharose wurde einige Male abwechselnd in 1M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 8 und 1 M NaCl, 0,1 M Borzsäure gewaschen und anschließend in phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 1mM Benzamidinhydrochlorid eluiert. Die aus Schritt b) erhaltenen Fraktionen wurden in eine Konzentration von 0,2 M NaCl, 10mM Tris/HCl, pH 8 eingestellt. Die TNF-Sepharose wurde in eine Säule gepackt und mit 0,2 M NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8 gewaschen und die TNF-BP enthaltenden Fraktionen entsprechend ca. 30 g Protein, bei einer Durchflussrate von 10 ml/h aufgetragen und ausgiebig mit 0,2 M NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8 gewaschen, bis im Eluat

keine Absorption mehr nachweisbar war. Anschließend wurde TNF-BP mit 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5 eluiert.

TNF-BP enthaltende Fraktionen aus 4 Auftrennungen wurden vereinigt und nach Zusatz von Polyethylenglykol (MG 6000) - bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml - lyophilisiert. Die lyophilisierte Probe wurde in destilliertem Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser dialysiert. (Die dialysierte Probe (4 ml) wurde in tiefgefrorenem Zustand gelagert.)

Dieser Reinigungsschritt brachte gegenüber dem vorangegangenen eine weitere Anreicherung um das ca. 9000 fache. SDS-PAGE (durchgeführt, wie in Vorversuch 2 beschrieben) der TNF-BP enthaltenden Fraktionen zeigte die Elution von drei Hauptkomponenten mit Molekulargewichten von 28 000, 30 000 und 50 000 .

d) Reverse Phase Chromatographie

Ein aliquoter Anteil (1 ml) der aus Schritt c) erhaltenen Fraktionen mit einem Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure wurde auf eine ProRPC HR 5/10 Säule (Pharmacia), die an ein FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,1 %iger Trifluoressigsäure equilibriert und bei Raumtemperatur mit einem linearen 15 ml Gradienten von 10 Vol% bis 50 Vol% Acetonitril, enthaltend 0,1 % Trifluoressigsäure, beschickt; die Durchflußrate betrug 0,3 ml/min. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und die Absorption bei 280nm sowie die Aktivität des TNF- α bindenden Proteins mit Hilfe des Kompetitionsbindungstest, wie im Beispiel 1 angegeben, bestimmt, wobei jeweils 0,01 μ l Probe verwendet wurden. TNF-BP eluierte als ein einziger

Aktivitätspeak entsprechend einem scharfen UV-Absorptionspeak.

Dieser letzte Reinigungsschritt brachte eine Zunahme der spezifischen Aktivität um das ca. 29 fache, die Gesamtzunahme an Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial (konzentrierter Dialyseharn) betrug das ca. $1,1 \times 10^6$ fache.

SDS-PAGE der reduzierten und nicht reduzierten Probe, durchgeführt wie in Vorversuch 2 angegeben, ergab eine diffuse Bande, die auf das Vorhandensein eines einzigen Polypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 hinwies. Das diffuse Erscheinungsbild der Bande kann auf das Vorliegen einer oder mehrerer heterogener Glykosylierungen und/oder eines zweiten, in geringer Menge vorhandenen Polypeptids zurückzuführen sein. Die Annahme, dabei könnte es sich um ein Polypeptid mit dem in Vorversuch 3d als Nebensequenz bestimmten N-Terminus handeln, das gegenüber TNF-BP am N-Terminus verlängert ist, wurde durch die Sequenz der cDNA bestätigt, wonach zwischen der Signalsequenz und Asn (Pos.12) ein Abschnitt von 11 Aminosäuren vorliegt, dessen Sequenz mit der N-terminalen Nebensequenz übereinstimmt und der offensichtlich vom prozessierten Protein abgespalten wird.

Vorversuch 2

SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (24) auf 18 cm langen, 16 cm breiten und 1,5 mm dicken Flachgelen mit 10 Taschen mittels einer LKB 2001 Elektrophorese-Einheit durchgeführt. Der Proteingehalt

26.01.96 10:00 Uhr

der Proben aus den Reinigungsschritten c) und d) (Vorversuch 1) wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt bzw. aus der Absorption bei 280 nm berechnet, wobei einer Absorption von 1,0 ein Gehalt von 1 mg TNF-BP/ml zugeordnet wurde.

Die Proben, enthaltend ca. 25 µg Protein (aus Vorversuch 1c) bzw. ca. 5 µg (aus 1d) in reduzierter (β -Mercaptoethanol) und nicht reduzierter Form wurden auf ein 3%iges Sammelgel und ein 5 bis 20%iges lineares Polyacrylamidgradientengel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 25mA/Gel ohne Kühlung gefahren. Als Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) wurden Phosphorylase B (MG 94 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000), Ovalbumin (MG 43 000), Karboanhydrase (MG 30 000), Sojabohnen-Trypsininhibitor (MG 20 100) und a-Laktalbumin (MG 14 400) verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie Blue in 7%iger Essigsäure/40%igem Ethanol gefärbt und in 7%iger Essigsäure/25%igem Ethanol entfärbt.

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigte TNF-BP als Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 30.000 .

Vorversuch 3

a) Probenvorbereitung

15 µg des nach Vorversuch 1d) gereinigten Proteins wurden

Über Reverse Phase HPLC entsalzt und weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1 %ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile

Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68 % Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion wurde gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70 %iger Ameisensäure gelöst und direkt für die Aminosäuresequenzanalyse verwendet.

b) Aminosäuresequenzanalyse

Die automatische Aminosäuresequenzanalyse wurde mit einem Applied Biosystems 477 A Flüssigphasensequenator durch On-line Bestimmung der freigesetzten Phenylthiohydantoin-Derivate mittels Applied Biosystems Analysator, Modell 120 A PTH, durchgeführt.

Sie ergab die folgende N-terminale Sequenz als Hauptsequenz

(ca. 80 % der Proteinmenge): Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-.

Daneben war folgende Nebensequenz nachzuweisen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-. (Die in Klammer stehenden Aminosäuren konnten nicht eindeutig identifiziert werden.)

Vorversuch 4

SDS-PAGE

Die Probenvorbereitung wurde wie im Vorversuch 3 durchgeführt mit dem Unterschied, daß die Probenmenge 10 µg betrug. Die Probe wurde in 50 µl Wasser aufgenommen und in 4 Portionen geteilt. Einer der vier aliquoten Teile wurde zur Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (24) mit DTT (Dithiothreitol) reduziert und auf Minigelen (Höfer, 55x80x0,75 mm, 15 %) getrennt; als

In unsere kopie auch ~~hier~~ nicht leserlich

31

angegebene verwendet. Die Färbung erfolgte nach der Methode von Oakley (25). Das Elektropherogramm ist in Fig. 9 dargestellt. Es zeigt eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 30 000.

Beispiel 1

a) Tryptic Peptide Mapping

Etwa 60 µg des nach Vorversuch 1d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 60 µl 1%igem Ammoniumbicarbonat gelöst.

Dieser Lösung wurden 1% w/w, entsprechend 0,6 µg Trypsin (Boehringer Mannheim) zugesetzt und die Reaktionsmischung 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden nochmals 1% w/w Trypsin zugesetzt und die Inkubation über Nacht fortgesetzt.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde der Reaktionsansatz anschließend mit 60 µl 6 M Harnstoff und mit 12 µl 0,5 M Dithiothreitol versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Spaltpeptide erfolgte über Reverse Phase HPLC, wobei eine Delta Pak C18 Säule (Waters, 3,9 x 150 mm, 5 µm Teilchendurchmesser, 100 Å Porendurchmesser) bei 30°C und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet wurden. Die Gradientensteigerung betrug 0 bis 55% Eluens B in 55 min, danach wurde 55% B für 15 min beibehalten. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm (0,5 AUFS) und bei 280 nm (0,05 AUFS).

b) Sequenzanalyse von tryptischen Peptiden

Einige der nach a) gewonnenen tryptischen Spaltpeptide von TNF-BP wurden der automatischen Aminosäuresequenzanalyse unterworfen. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen aus der Reverse Phase HPLC gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70%iger Ameisensäure gelöst. Diese Lösungen wurden direkt für die Sequenzierung in einem Applied Biosystems 477 A Pulsed Liquid Phase Sequenator eingesetzt. Tab.1 enthält die Ergebnisse der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide, wobei die in Klammern angeführten Aminosäuren nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Die Angabe "X" bedeutet, daß an dieser Stelle die Aminosäure nicht identifiziert werden konnte.

In der Fraktion 8 konnte die Aminosäure in Position 6 nicht identifiziert werden. Die Sequenz -X-N-S- für die Position 6-8 läßt

Form vorliegt.

In der Fraktion 17 konnte die Aminosäure in Position 6 ebenfalls nicht identifiziert werden. Die Sequenz -X-N-S- (bereits in Fraktion 8 auftretend) für die Positionen 6 bis 8 lässt vermuten, daß die Aminosäure 6 in glykosylierter Form vorliegt. Die ersten 13 Aminosäuren der Fraktion 17 sind weitgehend identisch mit der Fraktion 8; bei Fraktion 17 dürfte es sich somit um ein Peptid handeln, das durch unvollständige tryptische Spaltung entstanden ist.

Auffallend ist die Identität der Fraktion 21 mit den Positionen 7 bis 14 der Fraktion 27. Sowohl in Fraktion 21 als auch in Fraktion 27 bricht die Sequenz nach der Aminosäure Asparagin (Position 8 bzw. 14) plötzlich ab, obwohl hier keine tryptische Spaltung zu erwarten ist. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Aminosäure Asparagin (Position 8 in Fraktion 21 bzw. Position 14 in Fraktion 27) die C-terminale Aminosäure von TNF-BP sein könnte.

Auffallend ist die weitgehende Identität der Sequenz der nur in geringer Menge auftretenden Fraktion 12 mit der in Vorversuch 10 bestimmten Nebensequenz des N-Terminus. Daß die Proteine der Haupt- und Nebensequenz auf einer analytischen Reverse Phase HPLC-Säule (Vorversuch 3b) nicht trennbar waren, lieferte einen Hinweis dafür, daß es sich bei dem Protein mit der Nebensequenz um eine am N-Terminus verlängerte Form des TNF-BP handelt, die durch Prozessierung zum Großteil in das Protein mit der Hauptsequenz überführt wird.

Faktion	Aminosäuresequenz
1	D - S - V - C - P - Q - G - K
2	X - X - L - S - (C) - S - K
3	D - T - V - (C) - G - (C) - R
4	E - N - E - (C) - V - S - (C) - S - N - (C) - K
5	E - N - E - (C) - V - S - (C) - (S) - N - (C) - K - (K)
8	Y - I - H - P - Q - X - N - S - I - X - X - X - K
11	E - C - E - S - G - S - F - T - A - S - E - N - (N) - (K)
12	L - V - P - H - L - G - D - R
13	K - E - M - G - Q - V - E - I - S - S - (C) - T - V - D - (R)
14/I	G - T - Y - L - Y - N - D - C - P - G - P - G - Q -
14/II	(E) - M - G - Q - V - (E) - (I) - (S) - X - X - X - (V) - (D) -
15	K - E - M - G - Q - V - E - I - S - S - (C) - T - V - D - R - D - T - V - (C) - G -

17

Y - I - H - P - Q - X - N - S -
 I - (C) - (C) - T - K - (C) - H -
 K - G - X - Y -

20

G - T - Y - L - Y - N - D - C -
 P - G - P - G - Q - D - T - X -
 X - R

21

L - (C) - L - P - Q - I - E - N

26

Q - N - T - V - (C) - T - X - (H) -
 A - G - F - (F) - L - (R)

27

S - L - E - (C) - T - K - L -
 (C) - L - P - Q - I - E - N

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der analysierten
 tryptischen Peptide von TNF-Bp

Beispiel 2

Analyse des C-Terminus

Diese Analyse wurde nach dem Prinzip der in (31)
 beschriebenen Methode durchgeführt.

Etwa 60 µg des nach Vorversuch 2d) gereinigten Proteins
 wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit
 weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18
 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige
 Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in
 Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die
 Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24
 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei

280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 120 μ l 10 mM Natriumacetat (auf pH 4 gestellt mit 1 N HCl) gelöst.

Dieser Lösung wurden 6 μ l Brij 35 (10 mg/ml in Wasser) sowie 1,5 μ l Carboxypeptidase P (0,1 mg/ml in Wasser, Boehringer Mannheim, Nr. 810142) zugesetzt. Das entspricht einem Gewichtsverhältnis Enzym zu Protein von 1 zu 400 (36).

Sofort nach Zusatz des Enzyms wurde eine Probe von 20 μ l der Reaktionsmischung entnommen und darin die enzymatische Reaktion durch Ansäuern mit 2 μ l konzentrierter Trifluoressigsäure und durch Gefrieren bei - 20°C unterbrochen.

Die Reaktionsmischung wurde im Kühlschrank (ca. 8°C) stehengelassen und Proben zu je 20 μ l nach 10, 20, 60 und 120 Minuten entnommen. Der Rest der Reaktionsmischung wurde weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme durch Zusatz von 2 μ l konzentrierter Trifluoressigsäure angesäuert und bei -20°C eingefroren, wodurch die enzymatische Reaktion unterbrochen wurde.

Parallel zum beschriebenen Probenansatz mit etwa 60 μ g TNF-BP wurde unter identischen Bedingungen ein Reagentienblindwert angesetzt, dem kein Protein zugesetzt worden war.

Nach der letzten Probennahme wurden alle Proben 30 Minuten lang in einem Speed Vac Concentrator

getrocknet, mit 10 μ l einer Lösung aus 2 Teilen Äthanol, 2 Teilen Wasser und 1 Teil Triäthylamin (= "Redrying solution" des Picotag-Aminosäureanalysesystems der Fa. Waters) versetzt und nochmals kurz getrocknet. Danach wurden die Proben zur Derivatisierung der vom C-Terminus abgespalteten Aminosäuren mit je 20 μ l des "Derivatisation Reagens" (7:1:1:1 = Äthanol : Wasser : Triäthylamin : Phenylisothiocyanat; Picotag-System) versetzt, 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 1 Stunde in einem Speed Vac Concentrator getrocknet.

Zur Analyse der derivatisierten Aminosäuren wurden die Proben in 100 μ l "Sample Diluent" (Picotag-System der Fa. Waters) gelöst. Von diesen Lösungen wurden je 50 μ l mit Reverse Phase HPLC (Säule, mobile Phase und Gradient nach Originalvorschrift des Picotag-Systems der Fa. Waters) analysiert. Die Chromatogramme der Proben und Reagentienblindwerte wurden mit dem Chromatogramm eines analog derivatisierten Gemisches (100 pMol/Aminosäure) von Standardaminoäuren (Fa. Beckman) verglichen.

Wie aus den quantitativen Ergebnissen der Picotag-Aminosäureanalyse (Tabelle 2) ersichtlich ist, ist Asparagin mit hoher Wahrscheinlichkeit die C-terminale Aminosäure von TNF-BP. Neben Asparagin konnten nach 240 Minuten Reaktionszeit auch Glutaminsäure und in geringerer Menge Isoleucin nachgewiesen werden. Signifikant über dem Reagentienblindwert liegende Mengen von anderen Aminosäuren konnten auch nach 240 Minuten Reaktionszeit nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis (-I-E-N als C-Terminus) bestätigt die aus der N-terminalen Sequenzierung der tryptischen Peptide 21 und 27 abgeleitete Vermutung, daß die bei diesen

Peptiden C-terminal identifizierten Aminosäuren - I-E-N
(Beispiel 1b) den C-Terminus von TNF-BP darstellen.

Reaktionszeit	Integratoreinheiten für die Aminosäuren		
	Isoleucin	Glutaminsäure	Asparagin
0	-	-	-
10	-	-	-
20	-	-	83.304
60	-	-	168.250
120	-	-	319.470
240	85.537	152.350	416.570

Tabelle 2: Quantitative Auswertung der Picotag-Aminosäureanalyse nach Reaktion von Carboxypeptidase P mit TNF-BP

Methoden zu den Beispielen 3 bis 7:

Um die Beschreibung der nachfolgenden Beispiele zu vereinfachen, werden oft wiederkehrende Methoden bzw. Bezeichnungen kurz beschrieben:

"Schneiden" oder "Verdauen" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) an für diese spezifischen Stellen (Restriktionsstellen). Restriktionsendonukleasen sind käuflich erhältlich und werden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Puffer, Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein, Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz) eingesetzt. Restriktionsendonukleasen werden mit einem Großbuchstaben, meist gefolgt von Kleinbuchstaben und

normalerweise einer römischen Ziffer, bezeichnet. Die Buchstaben hängen von dem Mikroorganismus ab, aus dem die betreffende Restriktionsendonuklease isoliert wurde (z.B.: Sma I: *Serratia marcescens*).

Üblicherweise wird etwa 1 µg DNA mit einer oder mehreren Einheiten des Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung geschnitten. Normalerweise wird eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C verwendet, kann aber laut den Verwendungsvorschriften des Herstellers variiert werden. Nach dem Schneiden wird manchmal die 5' Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) entfernt. Dies dient zur Verhinderung einer ungewünschten Reaktion der spezifischen Stelle in einer nachfolgenden Ligasereaktion (z.B. Zirkularisierung eines linearisierten Plasmids ohne Insertierung eines zweiten DNA-Fragmentes). Wenn nicht anders angegeben, werden DNA-Fragmente nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen normalerweise nicht dephosphoryliert. Reaktionsbedingungen für die Inkubation mit alkalischer Phosphatase sind z.B. dem M13 Cloning und Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) zu entnehmen. Nach der Inkubation wird Protein durch Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt und die DNA aus der wässrigen Phase durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Isolierung" eines bestimmten DNA Fragments bedeutet die Auftrennung der durch den Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente, z.B. auf einem 1% Agarosegel. Nach der Elektrophorese und dem Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht durch Anfärben mit Äthidiumbromid (EtSr) wird das gewünschte Fragment anhand mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker lokalisiert und durch weitere Elektrophorese an DE 81

Papier (Schleicher und Schüll) gebunden. Die DNA wird durch Spülen mit Niedrigsalzpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA wird durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Transformation" bedeutet das Einbringen von DNA in einen Organismus, so daß die DNA dort replizierbar ist, entweder extrachromosomal oder chromosomal integriert. Transformation von *E.coli* folgt der im M13 Cloning and Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) angegebenen Methode.

"Sequenzieren" einer DNA bedeutet die Bestimmung der Nukleotidsequenz. Dazu wird zunächst die zu sequenzierende DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Fragmente werden in entsprechend geschnittene M13 mp8, mp9, mp18 oder mp19 Doppelstrang DNA eingebracht, oder es werden die DNA mittels Ultraschall fragmentiert, die Enden repariert und die größenselektionierten Fragmente in Sma I geschnittene, dephosphorylierte M13 mp8 DNA eingebracht (Shotgun Methode). Nach der Transformation von *E.coli* JM 101 wird Einzelstrang DNA aus rekombinanten M13 Phagen entsprechend dem M13 Cloning and Sequencing manual (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) isoliert und nach der Didesoxymethode (30) sequenziert. Als Alternative zur Verwendung des Klenowfragment der *E.coli* DNA Polymerase I bietet sich dabei die T7-DNA Polymerase an ("Sequenase, Fa. United States Biochemical Corporation). Die Sequenzreaktionen werden

entsprechend dem Handbuch "Sequenase: Step-by-Step Protocols for DNA Sequencing With Sequenase" durchgeführt.

Eine weitere Sequenziermethode besteht im Klonieren der zu sequenzierenden DNA in einen Vektor, der unter anderem einen Replikationsursprung eines DNA-Einzelstrangphagen (M13, f1) trägt (z.B. Bluescribe oder Bluescript M13 von Stratagene). Nach Transformation von E.coli JM101 mit dem rekombinanten Molekül können die Transformanten mit einem Helferphagen, zB. M13KO7 oder R408 von Promega) infiziert werden. Als Resultat erhält man eine Mischung aus Helferphagen und verpacktem, einzelsträngigem rekombinanten Vektor. Die Aufarbeitung der Sequenziervorlage (Template) erfolgt in Analogie zu der M13 Methode. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mittels der ursprünglich von R. Staden (27) entwickelten und von Ch. Pieler (28) modifizierten Computerprogramme.

"Ligieren" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Enden von Doppelstrang-DNA Fragmenten. Üblicherweise werden zwischen 0,02 und 0,2 µg DNA-Fragmente in 10 µl mit etwa 5 units T4-DNA Ligase ("Ligase") in einer geeigneten Pufferlösung ligiert (29: 474). "Präparation" von DNA aus Transformanten bedeutet die Isolierung der Plasmid DNA aus Bakterien mittels der alkalischen SDS Methode, modifiziert nach Birnboim und Doly (29: 368-369) unter Weglassen des Lysozyms. Dabei werden die Bakterien aus 1,5 bis 50 ml Kultur verwendet.

"Oligonukleotide" sind kurze Polydesoxynukleotide, die chemisch synthetisiert werden. Dazu wurde der Applied

Biosystems Synthesizer Modell 381A verwendet. Die Oligonukleotide werden entsprechend dem Modell 381A User Manual (Applied Biosystems) aufgearbeitet. Sequenzprimer werden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Andere Oligonukleotide werden bis zu einer Kettenlänge von 70 durch die "OPC"-Methode gereinigt (OPC = Oligonucleotid purification column, Applied Biosystems, Product Bulletin, January 1988). Längere Oligonukleotide werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese (6% Acrylamid, 0,15% Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, TBE-Puffer) gereinigt und nach der Elution aus dem Gel über eine G-25 Sepharosesäule entsalzt.

Beispiel 3

Herstellung von TNF-BP-spezifischen Hybridisierungssonden

Die Auswahl der Oligonukleotide wurde im Hinblick auf deren Verwendung zur Amplifizierung von cDNA mittels PCR getroffen:

- Aus der N-terminalen Aminosäuresequenz des TNF-Bindungsproteins (Hauptsequenz, erhalten aus Vorversuch 3 und Beispiel 1, Fraktion 1)

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-

wurde ein Heptapeptid-Bereich ausgewählt, der die niedrigste Komplexität eines gemischten Oligonukleotids zum Hybridisieren an cDNA zuläßt: Es sind dies die Aminosäuren 6 bis 12. Um die Komplexität des Mischoligonukleotids herabzusetzen, wurden vier

Mischoligonukleotide mit einer Komplexität von jeweils 48 hergestellt. Die Oligonukleotide wurden in Richtung der mRNA hergestellt, sie sind somit zum 3' Ende der Sequenz orientiert und identisch mit dem nichtkodierenden Strang des TNF-BP-Gens:

Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro

5'CAA GGT AAA TAT ATT CAT CC 3' TNF-BP #3/1 EBI-1639
 G G C C C
 A

5'CAA GGC AAA TAT ATT CAT CC 3' TNF-BP #3/2 EBI-1640
 G G C C C
 A

5'CAA GGA AAA TAT ATT CAT CC 3' TNF-BP #3/3 EBI-1641
 G G C C C
 A

5'CAA GGG AAA TAT ATT CAT CC 3' TNF-BP #3/4 EBI-1642
 G G C C C
 A

b) Aus der Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptides (Fraktion 11 des tryptischen Verdaus) der Aminosäuresequenz

Glu-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Phe-Thr-Ala-Ser-(Glu/Cys)-Asn-Asn-Lys (vgl. Beispiel 1)

wurde ein Peptid-Bereich ausgewählt und ein weiterer

Satz von Mischoligonukleotiden synthetisiert:

-Phe-Thr-Ala-Ser-Glu-Asn-Asn-Lys

Cys

TNF-BP #4/5 (EBI-1653):

3'AAA TGA CGG AGA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T T T
 T

TNF-BP #4/6 (EBI-1654):

3'AAA TGA CGG TCA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T G T
 T

TNF-BP #4/7 (EBI-1657):

3'AAA TGA CGG AGA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T T G
 T

TNF-BP #4/8 (EBI-1658):

3'AAA TGA CGG TCA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T G G
 T

Die Oligonukleotide wurden komplementär zur mRNA synthetisiert und sind somit zum 5' Ende der Sequenz orientiert. Um das amplifizierte DNA-Fragment im Anschluß an die PCR effizient klonieren zu können, wurde auch ein BamHI-Linker am 5' Ende der Oligonukleotide vorgesehen. Werden z.B. die Oligonukleotide TNF-BP #4/5-8 gemeinsam mit TNF-BP #3/1-4 für die PCR an der gesamten Lambda-DNA einer Bibliothek eingesetzt, kann ein etwa resultierendes DNA Fragment mit BamHI nachgeschnitten werden. Die Partner-Oligonukleotide ergeben ein gerades Ende am

5'Terminus, das Fragment kann somit in die SmaI-SamHI-Stellen eines geeigneten Vektors kloniert werden. Jedes Mischoligonukleotid TNF-BP #4/5 bis 8 ist eine Mischung aus 48 Einzelnukleotiden und berücksichtigt einige Codons nicht, und zwar:

Thr	ACG
Ala	GCG und GCT
Ser	TCG und TCC
Asn	AAT

Bei GCT wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das zu GCC (Ala) komplementäre Triplet CGG durch Ausbildung einer G-T Brücke wirksam sein kann, bei TCG (Ser) und AAT (Asn) gilt dasselbe bezüglich AGT bzw. TTG.

ACG, GCG und TCG sind äußerst seltene Codons (CG-Regel) und wurden deshalb nicht berücksichtigt.

Beispiel 4

Amplifizierung einer für TNF-BP kodierenden Teilsequenz aus einer cDNA-Bibliothek.

a) Isolierung von Lambda-DNA einer cDNA Bibliothek

Die Herstellung der cDNA Bibliothek erfolgte nach der in der EP-A1-0293 567 für die humane plazentale cDNA Bibliothek beschriebenen Methode mit dem Unterschied, daß als Ausgangsmaterial 10^9 Fibrosarkomzellen der Zelllinie HS 913 T, die unter Stimulierung mit humanem TNF- α (10 ng/ml) hochgezüchtet worden waren, verwendet wurden. Statt Lambda gt10 wurde Lambda gt11 verwendet

(cDNA Synthese: Amersham RPN 1256; EcoRI verdaute Lambda gt11 Arme: Promega Biotech; in vitro Verpacken der ligierten DNA: Gigapack Plus, Stratagene).

5 ml des Phagenüberstandes der amplifizierten cDNA Bibliothek der humanen Fibrosarkom Zelllinie HS913T in Lambda gt11 wurden mit 0,5 µg RNase A und 0,5 µg DNase I versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Mischung wurde 10 min bei 5000xg zentrifugiert, der Überstand durch Extraktion mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA aus der wässrigen Phase durch Zusatz von Ethanol präzipitiert. Die Lambda-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris pH=7,5; 1 mM EDTA) gelöst.

b) PCR Amplifizierung einer TNF-BP Sequenz aus einer cDNA Bibliothek

Für die Anwendung der PCR (26) auf DNA der HS913T cDNA Bibliothek wurden 16 Einzelreaktionen durchgeführt, in welchen jeweils eines der 4 Mischoligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641, EBI-1642 als erster Primer und eines der vier Mischoligonukleotide EBI-1653, EBI-1654, EBI-1657, EBI-1658 als zweiter Primer eingesetzt wurde. Jedes dieser Mischoligonukleotide enthält 48 verschiedene Oligonukleotide gleicher Länge.

Die Amplifizierung mittels PCR fand in 50 µl Reaktionsvolumen, enthaltend 250 ng Lambda-DNA der cDNA-Bibliothek, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH=8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 0,2 mM jedes der 4 desoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 200 pMol erster und zweiter Primer, 1,25 Einheiten Taq Polymerase [Perkin-Elmer Cetus] statt. Um ein Verdunsten zu verhindern, wurde die Lösung mit einigen Tropfen Mineralöl (0,1 ml) überschichtet. Die PCR wurde in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus)

folgendermaßen durchgeführt: Die Proben wurden 5 Minuten auf 94°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren, und anschließend 40 Amplifikationszyklen unterworfen. Ein Zyklus bestand aus 40 Sekunden Inkubation bei 94°C, 2 Minuten Inkubation bei 55°C und 3 Minuten Inkubation bei 72°C. Am Ende des letzten Zyklus wurden die Proben für weitere 7 Minuten bei 72°C inkubiert, um sicherzustellen, daß die letzte Primer-Verlängerung vollständig verläuft. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol präzipitiert.

5 µl jeder der 16 PCR-Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Die stärkste DNA Bande, ein Fragment von 0,16 kb Länge, war in den PCR-Proben zu sehen, die mit dem Oligonukleotid EBI-1653 als erstem Primer und einem der Oligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641 oder EBI-1642 als zweitem Primer amplifiziert worden waren. Da die mit dem Primerpaar EBI-1653 und EBI-1642 amplifizierte Probe die größte Menge an diesem 0,16 kb DNA-Fragment enthielt, wurde diese Probe für die weitere Aufarbeitung ausgewählt.

Beispiel 5:

Klonierung und Sequenzierung eines durch PCR Amplifikation gewonnenen DNA-Fragments

Das erhaltene PCR-Produkt der Primer EBI-1642 und EBI-1653 wurde mit BamHI geschnitten und nachfolgend elektrophoretisch in einem Agarosegel (1.5% NuSieve GTG Agarose plus 1% Seakem GTG Agarose, FMC Corporation) nach der Größe aufgetrennt. Die

Hauptbande, ein DNA Fragment von 0,16 kb Länge, wurde aus dem Gel elektroeluiert und mit Ethanol präzipitiert. Dieses DNA Fragment wurde mit BamHI/SmaI geschnittenem Plasmid pUC18 (Pharmacia) ligiert und *E. coli* JM101 mit dem Ligationsgemisch transformiert. Die nach der Minipräparationsmethode hergestellten Plasmide wurden durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen PvuII und EcoRI-BamHI und nachfolgender Elektrophorese in Agarosegelen charakterisiert. Das Plasmid pUC18 enthält zwei Schnittstellen für PvuII, die in einem 0,32 kb DNA-Fragment die Polyklonierstelle flankieren. Sehr kurze-DNA-Inserts in der Polyklonierstelle des Plasmids können nach Schneiden mit PvuII leichter im Agarosegel sichtbar gemacht werden, da sich die Länge um 0,32 kb vergrößert. Durch Schneiden mit EcoRI und BamHI kann das in den mit BamHI und SmaI geschnittenen Plasmidvektor ligierte DNA-Fragment inklusive einiger Basenpaare der Polylinkersequenz erhalten werden. Ein Klon mit dem gewünschten Insert wurde als pTNF-BP3B bezeichnet. Das gesamte DNA-Insert dieses Klons wurde nach Subklonieren eines EcoRI-BamHI Fragments in M13mp18 (Pharmacia) nach der modifizierten Dideoxy Methode mit Sequenase (United States Biochemical Corporation) sequenziert.

Die Analyse der durch PCR-amplifizierten DNA ergab folgende Sequenz (nur der nicht kodierende Strang ist abgebildet, darüber die abgeleitete Aminosäuresequenz):

5

10

Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
CAG GGG AAA TAT ATT CTC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC

15	20	25
Cys Thr Lys Cys His Lys <u>Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp</u>		
TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC		
30	35	
Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp <u>Thr Asp Cys Arg Glu Cys</u>		
TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT		
40	45	50
Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn Asn Lys		
GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG GAT CC		

Die ersten 20 und die letzten 29 Nukleotide (in Kursivschrift) entsprechen den Sequenzen der Primer-Oligonukleotide EBI-1642 bzw. dem Komplement von EBI-1653. Die Aminosäuren 38 bis 43 bestätigen die restliche Sequenz des tryptischen Peptides 11.

Weiters enthält das mittels PCR erzeugte DNA-Fragment die Sequenz des Peptides der Fraktion 20 des tryptischen Verdaus (Aminosäuren 20 bis 34, unterstrichen). Damit ist erwiesen, daß der Klon pTNF-BP3B von einer cDNA abgeleitet wurde, die für TNF-Bindungsprotein kodiert.
 pTNF-BP3B stellt damit eine Sonde, z.B. zum Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken nach TNF-BP cDNAs, dar.

Beispiel 6:

Isolierung von TNF-BP cDNA Klonen

Ca. 720.000 Phagen der HS913T cDNA Bibliothek in Lambda gt11 wurden auf ⁸E.coli Y1083 (Δ lacU169, pro::Tn5, tonA2, hsdR, supE, supF, metB, trpR, F⁻, λ ⁻, (pMC9)) plattiert (ca. 60.000 Phagen pro 14,5 cm

Petrischale, LB-Agar: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 1,5% Agar, Plattieren in Top-Agarose: 10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0,8% Agarose). Von jeder Platte wurden zwei Nitrozellulosefilter-Abzüge hergestellt. Die Filter wurden vorgewaschen (16 Stunden bei 65°C) in:

50 mM Tris/HCl pH=8,0
1 M NaCl
1 mM EDTA
0,1 % SDS

Die Filter wurden zwei Stunden bei 65°C prähybridisiert in:

6x SSC (0,9M NaCl, 0,09 M tri-Na-citrat)
5x Denhardt's (0,1% Ficoll, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% BSA (=Rinderserumalbumin))
0,1% SDS

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde:
pTNF-BP 3B wurde mit BamHI und EcoRI doppelt geschnitten und das ca. 0,16 kb Insert isoliert. 0,6 µg des Inserts in 32 µl werden bei 100°C denaturiert und mit je 60 pMol EBI-1642 und EBI-1653 durch Abkühlen auf 80°C über 10 Minuten und jähes Abkühlen in Eiswasser geprämt. Nach Zusatz von

10 µl α -³²P-dCTP (100 µCi, 3,7 MBq)
5 µl 10x Priming Puffer (0,1 M Tris/HCl pH=8,0,
50 mM MgCl₂)

2 µl je 1mM dATP, dGTP, dTTP

1 µl PolIK (Klenow Fragment der E.coli DNA Polymerase I, 5 Einheiten)

wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung (10 Minuten auf 70°C) erfolgt das Abtrennen der nichteingebauten Radioaktivität durch Chromatographie über Biogel P6DG (Biorad) in TE Puffer

(10 mM Tris/HCl pH=8, 1 mM EDTA). Eingebaut wurden 65×10^6 cpm.

Das Hybridisieren der Filter erfolgte in einem Gesamtvolumen von 80 ml 6xSSC/5X Denhardt's/0,1% SDS plus hitzedenaturierter Hybridisiersonde während 16 Stunden bei 65°C.

Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur in 6xSSC/0,01% SDS und einmal 45 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC/0,01% SDS und dreimal 30 Minuten bei 65°C in 2xSSC/0,01% SDS gewaschen. Die Filter wurden luftgetrocknet und anschließend an Amersham Hyperfilm 16 Stunden unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70°C exponiert. Insgesamt wurden 30 hybridisierende Plaques identifiziert (Lambda-TNF-BP #1-30)

Die Regionen mit den hybridisierenden Plaques wurden möglichst präzise ausgestochen, und die Phagen in 300 ml SM Puffer plus 30 ml Chloroform eluiert. Durch "Plaquereinigung" (Plattieren von ca. 200 Phagen pro 9 cm Petrischale beim zweiten Durchgang, bzw. ca. 20 Phagen pro 9 cm Petrischale beim dritten Durchgang, Filterabzüge doppelt, Vorbereiten, Hybridisieren und Waschen wie beim erstmaligen Durchsuchen beschrieben) wurden letztlich 25 hybridisierende Phagen vereinzelt (Lambda-TNF-BP #1-10, 12-24, 29,30).

Darstellung der rekombinanten Lambda-DNA von den Klonen Lambda-TNF-BP #13, 15, 23, 30.:

2×10^6 Phagen wurden auf E.coli Y1088 in Topagarose (10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0,8% Agarose) plattiert (14,5 cm Petrischale mit LB-Agarose (1,5% Agarose, 0,2% Glucose, 10 mM MgSO₄, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Platten (30 Minuten bei 4°C) wurde mit 10 ml Lambda-Diluent (10 mM Tris/HCl

pH=8,0, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA) überschichtet und 16 Stunden bei 4°C eluiert. Der Überstand wurde in 15 ml Corex Röhrchen transferiert und 10 Minuten bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman J2-21 Zentrifuge, JA20 Rotor). Der Überstand wurde in 10 ml Polycarbonat-Röhrchen dekantiert und bei 50000 rpm, 20°C bis $\omega^2 t = 3 \times 10^{10}$ zentrifugiert (Beckman L8-70, 50 Ti Rotor). Das Pellet wurde in 0,5 ml Lambda-Diluent resuspendiert und in Eppendorf Röhrchen (1,4 ml) transferiert. Nach Zusatz von 5 mg RNase A und 0,5 mg DNaseI und Inkubation bei 37°C während 30 Minuten und Zusatz von 25 ml 0,5 M EDTA, 12,5 ml 1 M Tris/HCl pH=8,0, 6,5 ml 20% SDS erfolgte weitere Inkubation bei 70°C für 30 Minuten. Die Lambda DNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Abschließend wurde die DNA in 100 ml TE-Puffer gelöst.

Beispiel 7:

Subklonierung und Sequenzierung von TNF-BP cDNA Klonen 15 und 23

Um die cDNAs der Klone Lambda-TNF-BP15 und Lambda-TNF-BP23, die bei der Hybridisierung die stärksten Signale gezeigt hatten, näher zu charakterisieren, wurden die cDNA-Inserts mit EcoRI aus der Lambda-DNA herausgeschnitten, nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegel eluiert und mit Äthanol präzipitiert. Die DNA-Fragmente von 1,3 kb (von Lambda-TNF-BP15) und 1,1 kb (von Lambda-TNF-BP23) wurden mit EcoRI geschnittenem und mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm dephosphoryliertem Plasmidvektor pT7/T3 α -18 (Bethesda Research Laboratories) mit T4 DNA Ligase ligiert und E.coli JM101 transformiert. Von einzelnen Bakterienkolonien, die nach Selektion auf Agaroseplatten mit Ampicillin

und X-gal keine blaue Färbung aufwiesen, wurde im Minipräparationsverfahren Plasmid-DNA hergestellt und durch Schneiden mit EcoRI und HindIII das Vorhandensein und die Orientierung des cDNA Inserts festgestellt. Plasmide, die das EcoRI Insert der Phagen Lambda-TNF-BP15 bzw. Lambda-TNF-BP23 so orientiert enthielten, daß das dem 5'-Ende der mRNA entsprechende Ende dem T7 Promoter zugewandt ist, wurden pTNF-BP15 bzw. pTNF-BP23 benannt. Die EcoRI Inserts von Lambda-TNF-BP15 und Lambda-TNF-BP23 wurden ebenfalls in mit EcoRI geschnittenen und dephosphorylierten M13mp19 Vektor ligiert und E.coli JM101 transformiert. Von einigen wahllos ausgewählten M13 Klonen wurde Einzelstrang-DNA präpariert und als Vorlage für die Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode verwendet.

An M13 Klonen, die die cDNA-Inserts in entgegengesetzter Orientierung enthielten, wurden mit dem universellen Sequenzierprimer und spezifisch synthetisierten Oligonukleotidprimern, die an das cDNA-Insert binden, beide DNA-Stränge vollständig sequenziert.

Die vollständige Nukleotidsequenz von 1334 Basen des cDNA-Inserts von Lambda-TNF-BP15 bzw. pTNF-BP15 ist in Figur 1 dargestellt. Die Basen 1-6 und 1328-1334 entsprechen den EcoRI-Linkern, die bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek an die cDNA angefügt worden waren. Die Nukleotidsequenz des cDNA-Inserts von Lambda-TNF-BP23 entspricht der von Lambda-TNF-BP15 (Basen 22-1100), flankiert von EcoRI-Linkern.

Literatur

1. Carswell, E.A., et al., 1975. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 25:3666-3670
2. Old, L.J. 1987. Nature (Lond.) 326:330-331
3. Aggarwal, B.B., et al. et al. 1985. Nature 318: 665-667
4. Gullberg, U., et al. et al. 1987. Eur. J. Haematol. 39:241-251
5. Beutler, B., et al. et al. 1985. Nature 316: 552 - 554.
6. Torti, F.M. et al. 1985. Nature (Lond.) 229:867-869
7. Mahoney Jr., J.R., et al. 1985. J. Immunol. 134:1673-1675.
8. Shalaby, M.R., et al. 1985. J. Immunol. 135:2069-2073.
9. Klebanoff, S.J., et al. 1986. J. Immunol. 136:4220-4225.
10. Mestan, J., et al. 1986. Nature (Lond.) 323:816-819.
11. Wong, G.H.W., et al. 1986. Nature (Lond.) 323:819-822.
12. Cerami, A., et al. 1988. Immunol. Today 9:28-31.
13. Tracey, K.J., et al. 1986. Science (Wash.D.C.) 234:470-474.
14. Tracey, K.J., et al. 1987. Nature (Lond.) 330:662-666.
15. Piquet, P.F., et al. 1987. Immunobiol. 175:27
16. Waage, A., et al. 1987. Lancet. ii: 355-357.
17. Seckinger, P., et al. 1987. J. Immunol. 139: 1546-1549.

18. Seutler B., et al. 1988. A common mediator. *Ann. Rev. Biochem.* 57:505-18
19. Oliff A., et al. 1987. *Cell* 555-63.
20. Seckinger P., et al. 1988. *J. Exp. Med.* :1511-16
21. Olsson I., et al. 1988. *Eur.J. Haematol.* 41: 414 - 420
22. Olsson I., et al. 1989. *Eur.J. Haematol.* 42: 270 - 275
23. Creasey, A.A., et al. 1987. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* Vol 84, : 3293-3297
24. Laemmli U.K. . 1970. *Nature (London)* 227:680-4.
25. Oakley, B.R., et al. 1986. 105:361-363.
26. Saiki, R.K., 1988. *Science* 239: 487-491
27. Staden, R.,1982. *Nucleic Acid Res.* 10 : 4731-4751
28. Pieler Ch., 1987 *Dissertation, Universität Wien*
29. Maniatis, T., et al.1982. *Molecular Cloning A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory:* 474
30. Sanger et al. 1977. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 74 :5463-5467
31. Hsieng, S.L., et al. 1988. *J. Chromatography* 447: 351-364
32. Stauber, G.B., et al. 1988. *J.Biolog.Chem.* 35, Vol.263: 19098-19104
33. Aggarwal, B.B., et al. 1985. *Nature* 318: 655-667
34. Locksley, R.M., et al. 1987. *J.Imunol.* 139: 1891-1895
35. Stauber, G.B., et al. 1989. *J.Biolog.Chem.* 6, Vol.264: 3573-3576
36. Frohman, M.A., et al. 1988.*Proc.Natl.Acad.Sci. USA* Vol 85: 8998-9002

Patentansprüche

1. DNA, kodierend für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden, bzw. für ein Polypeptid, von dem dieses TNF bindende Protein eine Teilsequenz darstellt.
2. DNA nach Anspruch 1, kodierend für TNF bindendes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel R^2 GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG AAT aufweist, wobei R^2 gegebenenfalls fehlt oder eine für ein in vivo abspaltbares (Poly)peptid kodierende DNA darstellt, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.
3. DNA nach Anspruch 2, kodierend für sekretierbares TNF bindendes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in Anspruch 2 definierte Formel aufweist, wobei R^2 eine zur Gänze oder teilweise für eine Signalsequenz kodierende DNA darstellt.

4. DNA nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R² die Formel CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA aufweist.

5. DNA Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß R² für R³ CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA steht, wobei R³ eine für ein Signalpeptid kodierende DNA darstellt.

6. DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß R³ für
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CCA
CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC
TCA GGG GTT ATT GGA
steht.

7. DNA nach Anspruch 1, kodierend für einen TNF-Rezeptor bzw. einen Abschnitt davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CCA
CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC
TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC
AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA
TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT
CCA CGC CCG GGG CAG GAT AGC GAC TGC AGG GAG TGT
GAG AGC CGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC
AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA
ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC
CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC
CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC
AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC
TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC
CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG

AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG GGC
 ACT GAG GAC TCA GGC ACC ACA GTG CTG TTG CCC CTG
 GTC ATT TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA TCC CTC CTC
 TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
 TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA
 CCT GAA AAA GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT ACT
 AAG CCC CTG GCC CCA AAC CCA AGC TTC AGT CCC ACT
 CCA GGC TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC AGT CCC GTG
 CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
 CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA
 GAG GTG GCA CCA CCC TAT CAG GGG GCT GAC CCC ATC
 CTT GCG ACA GCC CTC GCC TCC GAC CCC ATC CCC AAC
 CCC CTT CAG AAG TGG GAG GAC AGC GCC CAC AAG CCA
 CAG AGC CTA GAC ACT GAT GAC CCC GCG ACG CTG TAC
 GCC GTG GTG GAG AAC GTG CCC CCG TTG CGC TGG R¹
 aufweist, wobei R¹ für einen DNA-Abschnitt
 steht, der für die C-terminale Region der
 zytoplasmatischen Domäne des TNF-Rezeptors
 kodiert, bzw. daß sie den für den entsprechenden
 Rezeptor-Abschnitt kodierenden Abschnitt
 darstellt, einschließlich ihrer degenerierten
 Varianten.

8. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit der im Anspruch 7 definierten DNA unter Bedingungen niedriger Stringenz hybridisiert.
9. Rekombinantes DNA Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierte DNA enthält.
10. Rekombinantes DNA Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine in Anspruch 1 oder 7 definierte DNA enthält.

11. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 9, replizierbar in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß es mit der in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierten DNA funktionell verbundene Expressionskontrollsequenzen enthält.
12. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 10, replizierbar in eukaryotischen Wirtsorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einer in Anspruch 1 oder 7 definierten DNA funktionell verbundene Expressions-Kontrollsequenzen enthält.
13. Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit mindestens einem rekombinantern DNA Molekül gemäß Anspruch 11 transformiert ist.
14. Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit mindestens einem rekombinantern DNA Molekül gemäß Anspruch 12 transformiert ist.
15. Wirtsorganismus nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Säugetierzelle ist.
16. Verwendung des Wirtsorganismus nach Anspruch 15 zum Untersuchen von Substanzen auf ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β .
17. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierten DNA kodiert wird.

18. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer in Anspruch 1 oder 7 definierten DNA kodiert wird.

19. Verwendung von Polypeptiden nach Anspruch 17 oder 18 zum Untersuchen von Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit TNF- α und/oder TNF- β bzw. deren Rezeptor und/oder ihre Beeinflussung deren biologischer Wirkung.

20. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit rekombinanter DNA gemäß Anspruch 11 transformiert und gezüchtet und das exprimierte Protein isoliert wird.

21. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit rekombinanter DNA gemäß Anspruch 12 transformiert und gezüchtet und das exprimierte Protein isoliert wird.

22. Polypeptid nach Anspruch 17 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF auftritt.

23. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen.

24. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von infektiösen Erkrankungen.

25. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von parasitären Erkrankungen.

26. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von Schockzuständen.
27. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von pathologischen Zuständen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α auftreten.
28. Polypeptid nach Anspruch 17 als Diagnostikum zur Bestimmung von TNF- α und/oder TNF- β .
29. Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Aktivität von TNF- α wirksam hemmende Menge eines Polypeptids nach Anspruch 17.
30. Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Aktivität von TNF- β wirksam hemmende Menge eines Polypeptids nach Anspruch 17.

Zusammenfassung

Ausgehend von einem gereinigten TNF- α bindenden Protein wird die für dieses Protein kodierende DNA zur Verfügung gestellt. Dieses Protein stellt den extrazellulären Teil eines TNF-Rezeptors dar. Auf Basis der für das TNF-bindende Protein und einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA können Expressionssysteme zur Herstellung von rekombinantem TNF-bindenden Protein und TNF-Rezeptor verwendet werden. Rekombinantes TNF bindendes Protein kommt in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF auftritt, zur Anwendung.

Mit Hilfe des TNF-Rezeptors bzw. Fragmenten davon können z.B. Substanzen auf ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β untersucht werden.

Fig. 1/1

GAATTCTCTGGACTGAGGCTCCAGTTCTGGCCTTGGGG

TTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTATCTCTATGCCCGAGTCTCAACCCCTCAACTGTC
ACCCCAAGGCACCTGGACGTCTGGACAGACCGAGTCCCAGCCCCAGCACTGCC

GCTGCCACACTGCCCTGAGCCCAAATGGGGAGTGAGAGGCCA TAG CTG TCT GGC

S1 55 S10 S15
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC
216 225 234 243 252

S20 S25 S29 1...
Leu Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu
CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG
261 270 279 288 297

5 10 15
Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu LYS Arg Asp Ser Val Cys Pro
GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC
306 315 324 333 342

20 25 30
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr
CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
351 360 369 378 387

35 40 45
Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro
AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG
396 405 414 423 432

50 55 60
Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr
GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC
441 450 459 468 477

65 70 75
Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys
GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC
486 495 504 513 522

80 85 90
Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TGC ACA GTG GAC
531 540 549 558 567

95 100 105
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr
CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT
576 585 594 603 612

110 115 120
Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu
TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC
521 630 639 648 657

Fig. 1/2

125	130	135
Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys	Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val	
AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC	CAG GAG AAA CAG AAC ACC	GTG
666 675 684	693	702
140	145	150
Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe	Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val	
TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT	CTA AGA GAA AAC GAG TGT	TGT GTC
711 720 729	738	747
155	160	165
Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser	Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys	
TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC	CTG GAG TGC ACG AAG TTG	TGC
756 765 774	783	792
170	175	180
Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys	Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr	
CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG	GAC ACT GAG GAC TCA GGC ACC	
801 810 819	828	837
185	190	195
Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe	Phe Gly Leu Cys Leu Leu	
ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT TTC	TTT GGT CTT TGC CTT TTA	
846 855 864	873	882
200	205	210
Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr	Arg Tyr Gln Arg Trp Lys	
TCC CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG TAT	CGC TAC CAA CGG TGG AAG	
891 900 909	918	927
215	220	225
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys	Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys	
TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT	GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA	
936 945 954	963	972
230	235	240
Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr	Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn	
GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT	AAG CCC CTG GCC CCA AAC	
981 990 999	1008	1017
245	250	255
Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly	Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe	
CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC	TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC	
1026 1035 1044	1053	1062
260	265	270
Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe	Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr	
AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC	ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC	
1071 1080 1089	1098	1107
275	280	285
Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala Ala	Pro Arg Arg Glu Val Ala	
CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT	CCC CGC AGA GAG GTG GCA	
1116 1125 1134	1143	1152

Fig. 1/3

Pro Pro Tyr 290
CCA CCC TAT Gln Gly Ala Asp Pro 295
1161 1170 CAG GGG GCT GAC CCC ATC CTT GCG ACA GCC CTC 300
1179 1188 1197 Leu Ala Thr Ala Leu ;
Ser Asp Pro 305
TCC GAC CCC Ile Pro Asn Pro Leu 310
1206 1215 ATC CCC AAC CCC CTT Gln Lys Trp Glu Asp Ser 315
1224 1233 GAG TGG GAG GAC AGC 1242
His Lys Pro 320
CAC AAG CCA Gln Ser Leu Asp Thr 325
1251 1260 CAG AGC CTA GAC ACT GAT Asp Asp Pro Ala Thr Leu 330
1269 1278 GAC CCC GCG AGC ACG CTG 1287
Ala Val Val 335
GCC GTG GTG Glu Asn Val Pro Pro 340
1296 1305 GAG AAC GTG CCC CCG TTG Arg Trp
1314 1323 CGC TGG AA GGAATTCA
1332